

Identifikasi *Pepper vein yellows virus* yang Berasosiasi dengan Penyakit *Yellow Vein Banding* pada Tanaman Mentimun di Bali

Identification of *Pepper vein yellows virus* Associated with Yellow Vein Banding Disease on Cucumber Plant in Bali

I Dewa Nyoman Nyana¹, M. Tinny Lestariningsih. T¹,
Ni Nengah Putri Adnyani¹, Gede Suastika^{2*}

¹Universitas Udayana, Denpasar 80225

²Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Gejala menguning antara lamina daun (*yellow vein banding*) telah ditemukan pada tanaman mentimun di Bali sejak tahun 2014. Gejala pada tanaman mentimun tersebut memiliki kemiripan dengan gejala pada tanaman cabai yang disebabkan oleh infeksi *Pepper vein yellow virus*, anggota genus *Polerovirus*. Tujuan penelitian ialah membuktikan penyebab penyakit menguning antara lamina daun pada tanaman mentimun di Bali. Metode identifikasi menggunakan RT-PCR dan analisis sikuensing. Sepasang primer spesifik PeVYV-CP-F-*Bam*H1/PeVYV-CP-R-*Pst*I berhasil mengamplifikasi bagian protein selubung PeVYV dengan ukuran \pm 650 pb. Analisis sikuen nukleotida menunjukkan bahwa isolat mentimun Bali memiliki kemiripan > 95% dengan isolat PeVYV asal Bali, dan Rembang (Indonesia), Jepang serta Yunani yang menginfeksi tanaman cabai.

Kata kunci: *Polerovirus*, protein selubung, RT-PCR, sikuen nukleotida

ABSTRACT

Yellowing vein banding disease has been reported infecting cucurbit plants in Bali since 2014. Similar vein banding symptom on chilli pepper was observed previously, and early diagnosis indicated infection of *Polerovirus*. The objective of this research was to confirm the presence of *Polerovirus* infection on cucumber plant showing yellow vein banding symptom in Bali. Reverse transcription polymerase chain reaction – based detection method was conducted using specific primer pairs PeVYV-CP-F-*Bam*H1/PeVYV-CP-R-*Pst*I followed by sequencing and nucleotide sequence analysis. Specific DNA fragments of \pm 650 bp was successfully amplified from field samples. Nucleotide sequence analysis showed that the sequence has the highest similarity > 95% with *Pepper vein yellow virus* (PeVYV) infecting chili pepper from Indonesia (Bali, and Rembang), Japan, and Greece.

Key words: cucumber, nucleotide sequence, *Polerovirus*, RT-PCR

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, surel: gsuast@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit kuning dilaporkan mulai menginfeksi sejumlah pertanaman mentimun di daerah Bali sejak tahun 2014. Infeksi penyakit ini sebelumnya telah dilaporkan oleh Mizutani *et al.* (2011) dan Septariani *et al.* (2014). Penyakit kuning dilaporkan berasosiasi dengan *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). Penyakit kuning menyebabkan daun mengeriting, melepuh, dan menguning. Daerah sebaran ToLCNDV di Indonesia meliputi provinsi Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Daerah Istimewa Yogyakarta.

Penyakit kuning yang menginfeksi tanaman mentimun di Bali dilaporkan berasosiasi dengan spesies *Begomovirus* yang lain, yaitu *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) (Wiratama *et al.* 2015). Infeksi SLCCNV di Bali menunjukkan daun menguning, melepuh, mengeriting, dan malformasi yang hampir sama dengan infeksi ToLCNDV di Jawa, Indonesia (Mizutani *et al.* 2011; Septariani *et al.* 2014) dan di Thailand (Ito *et al.* 2008). Selain gejala tersebut, ditemukan juga gejala daun mentimun yang menguning, tetapi tidak mengalami malformasi maupun perubahan ukuran.

Suastika *et al.* (2012) melaporkan gejala serupa ketika survei tanaman cabai di Bali pada tahun 2011. Tanaman cabai yang ditemukan menunjukkan gejala klorosis, menguning antara lamina daun, akan tetapi ukuran daun masih normal. Deteksi molekuler dengan PCR menunjukkan sampel negatif terinfeksi *Begomovirus* dan positif terinfeksi *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) dari genus *Polerovirus*.

PeVYV merupakan salah satu patogen penting dari genus *Polerovirus* famili *Luteoviridae*. *Polerovirus* ditularkan kutudaun secara persisten sirkulatif nonpropagatif, sedangkan *Enamovirus* hanya ditularkan secara mekanis. Bentuk partikel *Polerovirus* ialah bulat dengan diameter 25–30 nm (D'Arcy dan Domier 2005).

Insidensi penyakit kuning pada tanaman mentimun di Bali diduga juga berasosiasi dengan PeVYV. Gejala khas infeksi kelompok

Polerovirus ialah menguning tanpa ada perubahan ukuran daun. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dan melaporkan infeksi *Polerovirus* pada tanaman mentimun di Bali.

BAHAN DAN METODE

Survei dan Pengumpulan Tanaman Sakit

Survei penyakit dan pengambilan daun tanaman sakit dilakukan pada bulan April 2015 di dua lahan pertanaman mentimun di Banjar Titigalar, Desa Bangli, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan, Provinsi Bali. Pengambilan sampel tanaman sakit dilakukan dengan metode *purposive sampling*. Sampel bergejala disimpan pada suhu -80 °C untuk kemudian dilakukan deteksi menggunakan metode *reverse transcription polmerase chain reaction* (RT-PCR).

Deteksi dengan RT-PCR

Sampel yang digunakan ialah daun bergejala keriting dan menguning. Ekstraksi RNA total dilakukan sesuai dengan prosedur Doyle dan Doyle (1987) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 0.1 g daun digerus dengan nitrogen cair dan ditambahkan 500 µL larutan penyangga CTAB (10% Cetyltrimethyl-ammonium bromida, 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris HCl pH 8, 0.5 M NaCl) yang mengandung β-mercapto-ethanol 1%. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 56 °C selama 30 menit, kemudian ditambah 500 µL klorofom:isoamilalkohol (C:I) (24:1). Campuran tersebut dikocok selama 15 menit dan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 12 000 rpm. Supernatan yang terbentuk (± 500 µL) dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahi isopropanol dari 2/3 kali total volume. Campuran tersebut diinkubasi selama 16 jam pada suhu 4 °C dan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 12 000 rpm. Endapan yang terbentuk dicuci dalam 500 µL etanol 70% lalu disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Endapan yang terbentuk dikeringanginkan, selanjutnya dilarutkan dalam 50 µL bufer TE pH 8 dan digunakan sebagai bahan cetakan untuk sintesis cDNA.

Sintesis cDNA dilakukan dengan menyiapkan kit reaksi (Thermo Scientific Inc., US) yang terdiri atas 3.2 μ L H₂O, 1 μ L bufer *reverse-transcription* 10x, 0.35 μ L DTT 50 mM, 2 μ L dNTP 10 mM, 0.35 μ L MMuLV, 0.35 μ L RNase inhibitor, 0.75 μ L oligo d(T) 10 mM, dan 2 μ L RNA total untuk setiap reaksi. Sintesis cDNA dilakukan pada suhu 65 °C selama 5 menit, 42 °C selama 60 menit, dan 70 °C selama 5 menit.

Amplifikasi didahului dengan denaturasi awal pada 94 °C selama 5 menit, dilanjutkan 35 siklus dengan tahapan denaturasi pada 94 °C selama 30 detik, aneling pada 50 °C selama 1 menit, ekstensi pada 72 °C selama 1 menit, dilanjutkan pascaekstensi 72 °C selama 10 menit. Amplifikasi dilakukan dengan primer PeVYV-CP-F-*Bam*H1(5'-AA TTAGGATCCAATACGGGAGGGGTTAG GAGAAAT-3')/ PeVYV-CP-R-*Pst*1(5'-AA TTAAGTGCAGTTTTCGGGTTGTGCAA TTGCACAGTA-3') dengan ukuran target \pm 650 pb (Suastika *et al.* 2012). Reaksi amplifikasi terdiri atas 12.5 μ L PCR green master mix (Thermo Scientific, US), 9.5 μ L dH₂O, 1 μ L primer PeVYV-CP-F-*Bam*H1 10 μ M, 1 μ L primer PeVYV-CP-R-*Pst*1 10 μ M, dan 1 μ L DNA. Amplifikasi dilakukan pada *automated thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystem, US).

Hasil amplifikasi cDNA dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Gel direndam dalam larutan etidium bromida selama 10 menit, dilanjutkan dalam air selama 5 menit. Visualisasi cDNA dilakukan di bawah sinar UV transiluminator dan didokumentasikan. Selanjutnya dilakukan perunutan nukleotidanya.

Perunutan Nukleotida dan Analisis Filogenetika

Perunutan nukleotida dilakukan dengan mengirimkan produk amplifikasi ke PT Genetika Science Indonesia. Hasil perunutan nukleotida dibandingkan dengan data pada GenBank. Data yang berasal dari GenBank kemudian digunakan untuk analisis kesamaan menggunakan perangkat lunak BioEdit v.7.0.5. Analisis filogenetika menggunakan

program MEGA v.6.06 berdasarkan algoritma Neighbor Joining dengan *bootstrap* 1000 kali.

HASIL

Gejala penyakit di lapangan menunjukkan tanaman mentimun menguning dan klorosis dengan tulang daun masih berwarna hijau, ukuran daun terlihat normal dan tidak mengalami malformasi (Gambar 1).

Deteksi *Pepper vein yellow virus* Menggunakan RT-PCR

Amplifikasi menggunakan primer spesifik PeVYV-CP-F-*Bam*H1/ PeVYV-CP-R-*Pst*1 menghasilkan fragmen DNA dari sampel tanaman bergejala pada ukuran \pm 650 pb (Gambar 2). Dua sampel dari lahan 1, dan seluruh sampel dari lahan 2 terdeteksi positif mengandung PeVYV. Sampel nomor 7 dari lahan 1 menghasilkan intensitas pita DNA yang kuat. Oleh karena itu, sampel ini dipilih untuk dianalisis sikuen nukleotidanya.

Analisis Sikuen PeVYV Asal Tanaman Mentimun

Analisis sikuen nukleotida isolat asal mentimun Bali mempunyai homologi tertinggi

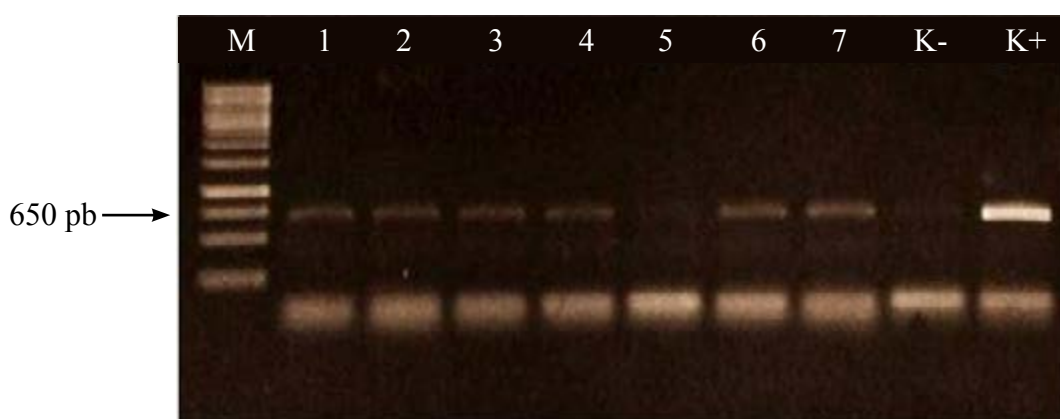


Gambar 1 Gejala PeVYV pada tanaman mentimun di Bali. Daun mentimun menguning dan klorosis dengan tulang daun masih berwarna hijau.

dengan PeVYV asal Bali, Rembang, Jawa Tengah, dan Jepang yang menginfeksi tanaman cabai dengan nilai lebih dari 95%. Nilai homologi sikuen nukleotida isolat PeVYV Bali dari tanaman mentimun memiliki tingkat kemiripan sebesar 90.7% dengan *Tobacco vein distorting polerovirus* (TobVDV) asal Cina (Tabel 1).

Analisis sikuen nukleotida menggunakan pohon filogenetika juga menunjukkan bahwa

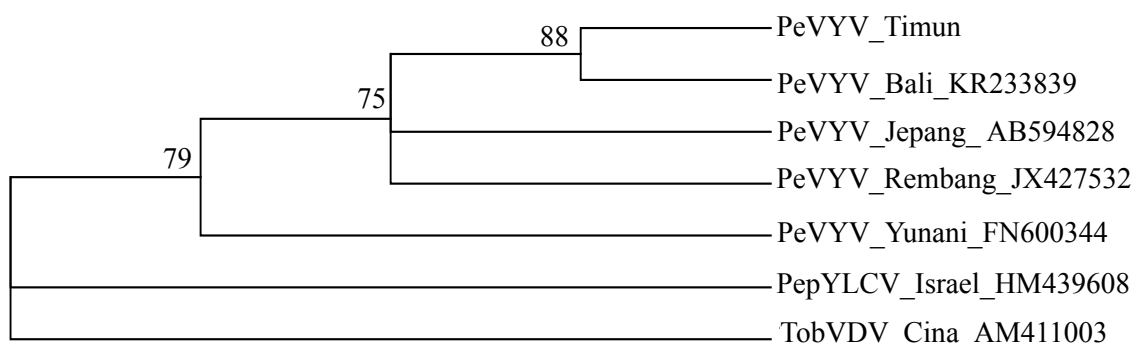
semua isolat PeVYV tergabung menjadi satu kelompok dan terpisah dengan TobVDV (Gambar 3). Isolat PeVYV Bali yang menginfeksi tanaman mentimun tergabung menjadi satu kelompok dengan isolat PeVYV Bali yang menginfeksi tanaman cabai. Semua isolat PeVYV tergabung dalam satu kelompok dan terpisah dengan PepYLCV dan TobVDV walaupun ketiganya merupakan anggota famili *Luteoviridae*.



Gambar 2 Hasil amplifikasi PeVYV menggunakan sepasang primer PeVYV-CP-F-*Bam*H1/PeVYV-CP-R-*Pst*I. M, penanda DNA 1 kb (Thermo Scientific, US); 1 – 4, sampel dari lahan 2; 5 – 7, sampel dari lahan 1; K-, kontrol negatif; K+, kontrol positif.

Tabel 1 Tingkat homologi (%) gen selubung protein PeVYV isolat Bali dengan isolat *Polerovirus* lain

Isolat virus	Inang	No. akses	Homologi
PeVYV Bali	<i>Capsicum annuum</i>	KR233839	97.6
PeVYV Rembang	<i>Capsicum annuum</i>	JX427532	95.5
PeVYV Jepang	<i>Capsicum annuum</i>	AB594828	97.3
PeVYV Yunani	<i>Capsicum annuum</i>	FN600344	94.6
PepYLCV Israel	<i>Capsicum annuum</i>	HM439608	91.4
TobVDV Cina	<i>Capsicum annuum</i>	AM411003	90.7



Gambar 3 Pohon filogenetika PeVYV isolat timun dari Bali dan beberapa isolat PeVYV lainnya berdasarkan sikuen nukleotida gen protein selubung menggunakan program MEGA V6.06 dengan pendekatan Neighbor Joining dan pengulangan 1000 kali.

PEMBAHASAN

Infeksi PeVYV pertama kali dilaporkan pada tanaman paprika di Jepang sejak 1981 dengan gejala daun menguning dan menggulung (Yonaha *et al.* 1995). Infeksi PeVYV pada tanaman cabai di Indonesia dengan gejala klorosis dan menguning di antara tulang daun (tampak menyirip) dilaporkan pertama kali oleh Suastika *et al.* (2012). Selanjutnya, infeksi PeVYV pada cabai di Spanyol juga dilaporkan menunjukkan gejala menguning pada bagian antartulang daun dan diskolorasi pada buah yang matang (Villanueva *et al.* 2013). Gejala yang hampir sama akibat infeksi PeVYV juga dilaporkan di Sudan (Alfaro-Fernández *et al.* 2014), Cina (Zhang *et al.* 2015), dan Amerika Serikat (Alabi *et al.* 2015). Insidensi penyakit berdasarkan pengamatan gejala luar akibat infeksi PeVYV pada tanaman cabai di Texas bagian selatan mencapai 75% (Alabi *et al.* 2015).

Genom *Polerovirus* berutas tunggal dengan orientasi positif terdiri atas 6 ORF: (i) ORF0 mengode F-box, (ii) ORF1 mengode motif serin protease dan N-terminal *genome-linked protein*, (iii) ORF2 mengode *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp), (iv) ORF3 mengode gen protein selubung, (v) ORF4 mengode *gen movement protein*, dan (vi) ORF5 mengode *readthrough domain* dari ORF3 (D'Arcy dan Domier 2005; Dombrovsky *et al.* 2013). ORF3 dan ORF5 diketahui sebagai area paling konservatif untuk anggota famili *Luteoviridae*. PeVYV mempunyai kemiripan asam amino sebesar 76–92% pada bagian ORF 0–ORF 3 dan hanya 25% pada bagian ORF 5 dengan TobVDV (Murakami *et al.* 2011).

Deteksi molekuler PeVYV dengan RT-PCR sebagian besar menggunakan primer yang mengamplifikasi ORF3. Sepasang primer spesifik Pol-G-F/Pol-G-R berhasil mengamplifikasi PeVYV dari Sudan dan Spanyol pada setengah bagian ORF2 hingga setengah bagian ORF 3 (Villanueva *et al.* 2013; Alfaro-Fernández *et al.* 2014). Sepasang primer spesifik PeF/PeR juga digunakan untuk mengamplifikasi PeVYV di Cina pada bagian ORF3 dengan produk sebesar 351 pb (Zhang

et al. 2015). Alabi *et al.* (2015) melaporkan infeksi PeVYV pada tanaman cabai di Texas bagian selatan menggunakan 2 pasang primer spesifik yang mengamplifikasi bagian ORF1 dan ORF2. Pada penelitian ini, sepasang primer spesifik digunakan untuk anggota genus *Polerovirus* yang juga digunakan oleh Suastika *et al.* (2012) untuk mendeteksi PeVYV yang menginfeksi tanaman cabai di Bali.

Nilai kemiripan di atas 90% antara isolat PeVYV Bali dari tanaman mentimun dan TobVDV tidak mengindikasikan keduanya tergabung dalam satu spesies. Demarkasi famili *Luteoviridae* didasarkan pada sikuen ORF-nya yang memiliki nilai homologi asam amino >90%. (D'Arcy dan Domier 2005; Murakami *et al.* 2011). Nilai homologi asam amino ORF 0–ORF 3 antara TobVDV dan PeVYV berkisar antara 75.9% dan 90.9%, akan tetapi homologi pada ORF 5 hanya 25.1% (Murakami *et al.* 2011).

Infeksi PeVYV pada tanaman mentimun merupakan laporan pertama di Indonesia. Laporan ini sekaligus menambah informasi mengenai kisaran inang PeVYV. Sebelumnya PeVYV dilaporkan hanya menginfeksi tanaman cabai (*Capsicum* spp.) dan *Solanum nigrum* (Knierim *et al.* 2012). Beberapa kelompok *Polerovirus* yang telah dilaporkan menginfeksi *Cucurbitaceae* ialah *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, *Suakwa aphid-borne yellows virus*, *Pepo aphid-borne yellows virus*, dan *Luffa aphid-borne yellows virus* (Knierim *et al.* 2014).

DAFTAR PUSTAKA

- Alabi OJ, Al Rwahnih M, Jifon JL, Gregg L, Crosby KM, Mirkov TE. 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting pepper (*Capsicum* spp.) in the United States. Plant Dis. 99(11):1656. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0329-PDN>.
- Alfaro-Fernández A, ElShafie EE, Ali MA, El Bashir OOA, Córdoba-Sellés MC, Font MI. 2014. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting hot pepper in Sudan.

- Plant Dis. 98(10):1446. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0251-PDN>.
- D'Arcy CJ, Domier LL. 2005. Family Luteoviridae. Di dalam: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editor. *Virus Taxonomy, Eighth Report of The International Committee of Taxonomy of Viruses*. San Diego (US): Elsevier Academic Pr. hlm 891–900.
- Dombrovsky A, Glanz E, Pearlsman M, Lachman O, Doron-Faigenboim A, Antignus Y. 2013. The complete genomic sequence of *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) and its implications for our understanding of evolution dynamics in the genus *Polerovirus*. PLoS One. 8(7):1–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070722>.
- Doyle JJ, Doyle JJ. 1987. A rapid DNA isolation of procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19:11–19.
- Ito T, Sharma P, Kittipakorn K, Ikegami M. 2008. Complete nucleotide sequence of a new isolate of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting cucumber, bottle gourd, and muskmelon in Thailand. Arch. Virol. 153:611–613. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-0029-y>.
- Knierim D, Tsai WS, Maiss E, Kenyon L. 2014. Molecular diversity of *Poleroviruses* infecting cucurbit crops in four countries reveals the presence of members of six distinct species. Arch Virol. 159(6):1459–1465. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1939-5>.
- Mizutani T, Daryono BS, Ikegami M, Natsuaki KT. 2011. First report of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting cucumber in Central Java, Indonesia. Plant Dis. 95(11):1485. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0196>.
- Murakami R, Nakashima N, Hinomoto N, Kawano S, Toyosato T. 2011. The genome sequence of pepper vein yellows virus (family Luteoviridae, genus *Polerovirus*). Arch Virol. 156:921–923. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-011-0956-5>.
- Septariani DN, Hidayat SH, Nurhayati E. 2014. Identifikasi penyebab penyakit daun keriting kuning pada tanaman mentimun. J HPT Tropika. 14(1): 80–86.
- Suastika G, Hartono S, Nyana IDN, Natsuaki T. 2012. Laporan pertama tentang infeksi *Polerovirus* pada tanaman cabai di Daerah Bali, Indonesia. J Fitopatol Indones. 8(5):151–154.
- Villanueva F, Castillo P, Font MI, Alfaro-Fernández A, Moriones E, Navas-Castillo J. 2013. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting sweet pepper in Spain. Plant Dis. 97(9):1261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0369-PDN>.
- Wiratama IDMP, Wiry GNAS, Adnyani NNP, Nyana IDN, Suastika G. 2015. Laporan pertama infeksi *Begomovirus* pada tanaman mentimun di Bali. J Fitopatol Indones. 11(5):175–178. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.11.5.175>.
- Yonaha T, Toyosato T, Kawano S, Osaki T. 1995. *Pepper vein yellows virus*, a novel *Luteovirus* from bell pepper plants in Japan. Ann Phytopathol Soc Jpn. 61:178–184. DOI: <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.61.178>.
- Zhang SB, Zhao ZB, Zhang DY, Liu Y, Luo XW, Liu J. 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting red pepper in Mainland China. Plant Dis. 99(8):1190. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0025-PDN>.